

⑤日本国特許庁 (JP)
⑥公表特許公報 (A)

①特許出願公表

平4-501605

⑦公表 平成4年(1992)3月19日

⑧Int.Cl. ⁵ G 01 N 33/543 33/547 33/548	級別記号 Q Z	序内整理番号 7906-2J 7906-2J 7906-2J*	審査請求未請求 予備審査請求有 部門(区分) 6(1)
--	----------------	--	-----------------------------------

(全10頁)

⑨発明の名称 バイオセンサーシステムに使用する選択的生体分子相互作用の可能な検出表面

⑩特 願 平1-511405
⑪出 願 平1(1989)11月9日

⑫翻訳文提出日 平3(1991)5月9日
⑬国際出願 PCT/SE89/00642
⑭国際公開番号 WO90/05303
⑮国際公開日 平2(1990)5月17日

優先権主張 ⑯1988年11月10日 ⑰スウェーデン(SE) ⑱8804073-8

⑨発明者 ベルイストリヨーム, ヤン スウェーデン国エス-740 22 ベーリング, リヨイニングス ヴ
エイエン3

⑩出願人 フアーマシア・ビオセンソル・ アクチエボラーグ スウェーデン国エス-751 82 ウブサラ (番地なし)

⑪代理人 弁理士 高木 千嘉 外2名

⑫指定国 A T(広域特許), B E(広域特許), C H(広域特許), D E(広域特許), F R(広域特許), G B(広域特許), I T
(広域特許), J P, L U(広域特許), N L(広域特許), S E(広域特許), U S

最終頁に統く

請求の範囲

1. 鋼、銀、アルミニウム及び金からなる群より選ばれる自由電子金属の膜からなり、前記膜の面の1つは有機分子X-R-Y (式中、Xは
非対称又は対称ジスルフィド (-SSB'Y'、-SSRY)、スルフィド (-SR'Y'、-SRY)、ジセレンド (-SeSeR'Y、
-SeSeRY)、セレンンド (SeR'Y'、-SeRY)、
チオール (-SR)、イソニトリル、ニトロ (-NO₂)、
セレノール (-SeR)、3価リン化合物、イソチオシアネート、キサンテート、チオカルバメート、ホスフィン、
チオ酸又はジチオ酸 (-COSB、-CSSB) の群の1つに
属し、ここでRとYは炭化水素基であって軽ましくは
複数分かれしておらず、場合によりヘテロ原子により中
断されており、及び10原子を越え、軽ましくは12~30
原子の長さであり (非対称分子の場合Y又はRはHで
あることができる)、及びYとY'は軽ましくは同一で
あり、既知の本來リガンド又は生適合性多孔質マトリ
ックスを共有結合させるための活性基、例えばヒドロ
キシル、カルボキシル、アミノ、アルデヒド、ヒドラ
ジド、カルボニル、エポキシ又はビニル基である)の
密に詰め込まれた单層で被覆されていることを特徴と
するバイオセンサーに使用する検出表面。
2. 単層X-R-Yに結合し、及びそれを介して所望の
リガンドを結合させることができる生適合性多孔質マ

- トリックスを含むことを特徴とする請求の範囲第1項
記載の検出表面。
2. 生適合性多孔質マトリックスはヒドロゲルであるこ
とを特徴とする請求の範囲第2項記載の検出表面。
3. ヒドロゲルは多糖類例えばアガロース、デキストラ
ン、カラゲナン、アルギン酸、澱粉及びセルロース、
又はこれらのいずれかの誘導体、又は脂質性有機ポリ
マー例えばポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、
ポリエチレングリコール又はポリアクリルアミドであ
ることを特徴とする請求の範囲第3項記載の検出表
面。
4. ヒドロゲルはデキストランからなることを特徴とす
る請求の範囲第4項記載の検出表面。
5. ヒドロゲルは所望のリガンドを固定化させるためヒ
ドロキシル、カルボキシル、アミノ、アルデヒド、カル
ボニル、エポキシ又はビニル基を含むように誘導体
化され、及び場合により生特異的リガンドを前記基を
介して結合させることを特徴とする請求の範囲第3項
又は第4項のいずれか一項記載の検出表面。
6. ヒドロゲルは所望のリガンドを固定化させるためヒ
ドロキシル、カルボキシル、アミノ、アルデヒド、カル
ボニル、エポキシ又はビニル基を含むように誘導体化され、及び
場合により生特異的リガンドは前記基又はデキストラ
ンのヒドロキシル基を介して結合させたことを特徴と
する請求の範囲第5項記載の検出表面。

特表平4-501605(2)

8. ヒドロゲルは(i)反対電荷を持つ生体分子の構造を実現するための電荷した基、及び(ii)検出表面に接続した生体分子を共有結合させるための反応性基を含むように活性化されたことを特徴とする請求の範囲第4項記載の検出表面。

9. 荷電した基はカルボキシル基であり、及び結合基は反応性エステル、ヒドラジド又は反応性ジスルフィド含有錯合体であることを特徴とする請求の範囲第8項記載の検出表面。

10. デキストランは(i)反対電荷を持つ生体分子の構造を実現するための荷電した基、及び(ii)検出表面に接続した生体分子を共有結合させるための反応性基を含むように活性化されたことを特徴とする請求の範囲第5項記載の検出表面。

11. デキストランはカルボキシル基で活性化され、前記カルボキシル基の一部分は反応性エステル、ヒドラジド、チオール又は反応性ジスルフィド含有錯合体の形態に活性化されたことを特徴とする請求の範囲第10項記載の検出表面。

12. 反応性ジスルフィド含有錯合体は反応性エステルと2-(2-ピリジニルジチオ)エタナミンとの間に反応により形成されることを特徴とする請求の範囲第9項又は第11項のいずれか一項記載の検出表面。

13. 2-アミノエタンチオール錯合体を含むことを特徴とする請求の範囲第9項又は第11項のいずれか一項記

明細書

バイオセンサーシステムに使用する選択的生体分子相互作用の可能な検出表面

本発明はバイオセンサーの分野に関し、より詳しくは選択的生体分子相互作用の能力のある表面を持つ金属表面を作る方法に関する。本発明は又所望のリガンドを結合させる活性化された表面、結合したリガンドを含む表面、及びそのような表面のバイオセンサーへの使用からなっている。

Aizawa (1983年)によれば、バイオセンサーは分子認識のためのリセプター、例えば固定化抗体を持つ選択的な層及び加工性シグナルへ相互作用情報を伝達するための変換器の特異な組合せであると定義される。そのようなバイオセンサーの一層はリセプターと周囲媒質との相互作用により表面の光学的性質に引き起こされる変化を検出するであろう。そのような方法の中で特に信頼性光法と表面プラスモン共鳴法を挙げることができる。この種類の方法が現実の実行において十分に働くためにはいくつかの要求、すなわち使用する検出表面（又は測定表面）が所望のリセプターを含み、更に如何なる非特異的結合すなわち意図する以外の成分の結合も生じない（又は無視し得る程度のみ生ずる）ように容易に錯合体化されるという要求が満たされなければならない。やや簡略化した表現を用いると表面プラスモン共鳴法（略称SPR、

これはsurface plasmon resonanceの頭字から導かれる）は金属薄膜に近接する層における屈折率の変化を反射光ビームの強度に結果として起こる変化により検出する方法であるといえる (Roether, B(1977年)が参照される)。

検出表面はリセプター又は「リガンド」（以後それらをこのように呼称する）であり、これらは一般に1つ又はそれより多い生体分子と選択的に相互作用する分子又は分子複合である。

金属膜は使用する測定法に適した種類の基材に適用する。SPRの場合、これは誘電体物質例えばガラス板の形態のそれが光束を金属表面に指向させるために使用することを意味する。

現在までに出版された大部分の刊行物によると、SPR法は生体分子の検出に適用する場合単純に問題の生体分子を直接金属表面に吸着させ、次いでその結果測定シグナルに現れる影響を調べることにより実行された。次の段階で、この表面は場合により最初に結合させた分子層に対して親和力を持つ分子（リガンド）の新しい層を結合させるために使用することができた。かくして例えば Liedberg, B等(1983年)は最初の研究において、最初に IgGの单層を銀表面に吸着させ次いで抗IgG層を前記单層に吸着させ、次に共鳴角に結果として起こる変化について影響を調べることにより、生化学的分析のためのSPR法の可能性を指摘している。

更にその他では、例えば Collen DC等(1987/88)は金

特表平4-501605(3)

黒を保ることが期待できない。更に別の問題は生化学的に存在する部質の多くは金属表面に直接作用を持つことである。

この種の問題の少なくとも一部分は欧洲 許第254575号による方法により解決され、が、この装置の構造はいくつかの明白な欠点を持っている。生体分子は硝酸セルロース膜に不可逆的に吸着されるというよく知られた事実から好みらしい構造による硝酸セルロースの形成のポリマーコーティングはいくつかの可能な応用に制限を加えるであろう。光学的表面検出法に基づくバイオセンサー系においては、そのような現象は検出表面と例えばヒト血清試料に存在する成分との間の非特異的相互作用による不明瞭且つ再現性のないシグナルを生ずることがある。そのような副作用は欧洲特許第254575号においては測定と対照表面の組合せを使用することにより校正された。この方法が善くための要件は非特異的寄与の大きさが測定表面で等しいことである。しかしながらこの条件は現実の実施において常に満たされるわけではない。

他の問題は欧洲特許第226470号で指摘されているように上述のそれと同様な構造物の製造に関連する(米国特許第4415666号も参照される)。明確書よりポリマーコーティングの許容される安定性、均一性及び再現性を得ることが如何に困難であるかを理解することができ、及びその結果生ずるバイオセンサー系を使用する場合の負の影響は容易に認識されるであろう。

被覆回折格子を持つSPE法を使用してIgG／抗IgG系における免疫複合体形成を調べる場合、金属表面への生体分子の直接吸着を利用した。

欧洲特許第257955号は金属膜をシリカで被覆し、場合によりシリカ化試薬で処理する方法を記述しており、及び欧洲特許第202021号では金属膜を有機層例えば異抗原に対する抗体を含むことがあるそれで被覆している。抗体を共有結合させる可能性は実際に明細書に述べられているが、有機層の実際の性質は全く開示又は示されておらず、又同じことが有機層を作る方法に当てはまる。

欧洲特許第254575号により、例えばSPE適用に適するような種類の光学的構造は金属膜を所謂「溶媒洗浄法」により有機ポリマーの層で被覆して作ることができる。好みらしい構造においては硝酸セルロースが使用され、及び生特異的リガンドを層に結合させるための種々の公知の方法が挙げられる。

この種の刊行物は方法の可能性について指摘する一方、開示された技術的解決法に固有のいくつかの限界についても説明している。

例えば欧洲特許第254575号で指摘されているように、問題の一つは生体分子が金属及びある種の無機表面と直接接触することにより少なくとも部分的な不活性化を受けやすいうことからなる。他の厄介な問題はある種の特別な適用に留ましいいくつかのリガンドは安定な様式で金属表面に吸着されることができず、従って再現性ある結

15~20nmの厚さの硝酸セルロース型のポリマーコーティングの多くの実際使用の場合、腐食に対して実際に十分な保護を加えるが、それでも拘らず小分子がそのような層を透過し、金属表面に不可逆的変化を引き起こす恐れがある。下に示すように現在の型の測定に因縁してある状況で出会うような硫黄化合物、例えば有機チオール化合物がタンパク質のジスルフィド結合の還元に使用される場合金属に対して高い親和力を持ち、吸着された場合金属の光学的性質に対して制御されない変化を生ずるであろう。又硝酸セルロース型のポリマーコーティングは例えば2% SDSによる界面活性剤処理により損傷を受けることが示された(欧洲特許第254575号参照)。

バイオセンサーシステム特にSPE用の一般に有用な検出表面は次の要件を満たすべきである。

それは使用する媒質に対して化学的に抵抗性であるべきである。

それはタンパク質及び他の生体分子と適合し得るものであり、所望される以外の如何なる分子とも相互作用すべきでない。

この方法の種々な分析的問題に対する一般的適用性に要求されるような多数のリガンドとの共有結合を形成する能力を持つべきである。

高度の感受性と力学を獲得するため、表面は網的分子をそこに結合させるため試料溶液用三次元マトリックスを提供すべきである。この方法で二次元表面を使用する

場合と比較して質量のより大きな部分がその屈折率の形で共鳴効果に影響することに利用されるであろう。

我々は今回好みらしい構造において、これらの要件をとりわけよく満足する表面を作り出した。

この金属表面は自由電子金属例えば銅、銀、アルミニウム又は金の膜で構成される。これらの金属は異なる共鳴効果を与え、又銀はこの観点から極めて良好であるが、それにも拘らず腐食安定性を考慮して金が好みらしい金属であると決定した。所望の生特異的リガンドを結合させるため、我々は金属表面に有機分子X-R-Yの单層を適用した。この単層は密に表面に詰め込まれており、リガンドの結合に使用される外、それは保存中極めて安定であり、及び金属表面を化学腐食から保護する有効なバリアー層を形成する。

一般にある種の硫黄化合物による金属表面の変性は例えばRusso EG等(1983年)、Porter ED等(1987年)、及びTroughton EB等(1988年)により記述されている。

密に詰め込まれた(densely packed) 単層(monolayer)の形態のX-R-Yは上述の刊行物に記述された原理により付着するようになり、結合は性質が部分的に共有結合であり、Xは金属に結合し、Yは官能性リガンドと結合する働きをする。これはリガンドを場合によりYの活性化後Yに直接結合させるか、又は生適合性多孔質マトリックス例えばヒドロゲルを、その上でマトリックスをリガンドと結合させるのに利用されるYを介してバリア

特表平4-501605(4)

合に関する多くの論文が文献中に見出され、使って利用可能な代替物質を選択することは当業者にとってたやすく明らかなことである。

この思想の明らかな実例は種々な有機分子X-R-Yの混合物の改善を含む。これは更に調節体化の増加した容量を獲得する目的、又は多官能性表面を得る目的で行うことができる。更にパリアー層はRegen BL等(1986年)により記述されているような方法で種々な種類のより複雑な分子例えば互いに連結した2つ又はそれより多い炭素鎖を含む分子を用いて形成させることができる。

必要により、パリアー層中で分子を架橋させることにより安定性を更に増加させることができる。これはR又はY中の官能基例えばR中の二重結合又は三重結合の先端部分により達成することができ、例えばBisgsdorf I等(1988年)が公報される。

所望のリガンド又は生体分子がYを介してパリアー層に直接結合している場合、上述の要件のいくつかは満たされ、許容できる結果を少なくともいくつかの実際的応用の場合に得ることができる。しかしながら肝ましくい具体化においては生適合性多孔質マトリックス例えばヒドロゲルをパリアー層に結合させ、及びこのマトリックスは致オングストローム～致オングストロームの厚さを持ち、標的生体分子に適したリガンドを固定化させるために使用される。実際の実施においてマトリックス層の厚さは測定システムの測定場所における測定シ

一層に結合させることにより実現され。

Xは次の群、すなわち

非対称又は対称スルフィド(-SSR'Y'、-SSRY)、スルフィド(-SR'Y'、-SRY)、ジセレンード(-SeSeR'Y'、-SeSeTY)、セレンード(SeR'Y'、-SeTY)、

チオール(-SH)、ニトリル(-CR)、イソニトリル、ニトロ(-NO₂)、セレノール(-SeH)、8価リン化合物、イソチオシアネット、キサンテート、チオカルバメート、ホスフィン、

チオ酸またはジチオ酸(-COSH、-CSSH)の1つに関する。

R(とY')は場合によりヘテロ原子により中断されており、肝ましくは適当に密な詰め込みのため直線(枝分かれしていない)であり、場合により二重及び/又は三重結合を含む説化水素鎖である。鎖の長さは10原子を超えない。より長い鎖の場合、安定性のより劣る層を生ずる。一般に12～30原子の鎖長が肝ましい。説化鎖は場合により過剰素化されることがある。

YとY'は肝ましくは同一であり、それらの標的物質に直接又は活性化後結合できる上のような性質を持つ。Y(及びY')は從って液体クロマトグラフィー法で固定化に使用される多くの基質例えばヒドロキシル、カルボキシル、アミノ、アルデヒド、ヒドラジド、カルボニル、エポキシ、又はビニル基のいずれかであることができる。これら又は他の基による種々なリガンド例えば生体分子の結

合の大きさに適合し、それにより測定条件の最適設定が得られるように選択される。SPR適用においてマトリックス層の厚さは肝ましくは5～10.000オングストローム特に5～1.000オングストロームである。従来技術と比較して単位面積当たり相当に高いリガンド密度がここに記述したマトリックスで得られ、この場合分子の結合は主として单層で起こる。このようにして相当に増強された測定シグナルが得られ、システムを大きな力学範囲で有用なものにする。

ここで考慮され、現在マトリックスの肝ましい具体化であるヒドロゲルはHerrill等(1986年)により定義される。ヒドロゲル結合はタンパク質適合性と非特異的相互作用の最小化に関する前述の要件のすべてを満たす検出表面を得るために必須である。Herrill等はヒドロゲル表面におけるそのような性質を示す多数の例を記述している。考えられる実際の適用により、いくつかの利用可能な選択肢から任意の特定のヒドロゲルを選ぶことができる。

ヒドロゲルは例えば多糖類例えばアガロース、デキストラン、カラゲナン、アルギン酸、藻粉、セルロース、又はこれらの衍生物例えばカルボキシメチル糊等、又は水溶性有機ポリマー例えばポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、ポリアクリルアミド、ポリエチレンゴリコールであることができる。

特にデキストラン型の多糖類は例えばセルロースとは

対称的に性質が非対称性であり、このような関係においては極めて適当である。デキストランは生体分子を結合するマトリックスとしてクロマトグラフィー操作で極めて広範囲に使用してきた。この思想が本来持つ利点の一つは実際にこの全技術が現在バイオセンサー適用、すなわち適当なリガンドが固定化されているバイオセンサー技術の最終段階に利用可能であることである。ヒドロゲルはパリアー層「金属-X-R-Y」に結合させるか、又はモノマー物質の適当な溶液からそのままの状態で形成させることができる。更に別の処理段階例えばその後のヒドロゲルの架橋は当業者にとって当然にたやすく明らかであろう。

この種類の表面変性は特異的又は二値的(即ち低い非特異的相互作用が一方の表面と他方のタンパク質又は他の生体分子との間で要求される他の技術分野にも利用することができる。挙げることが出来る例は生体分子分離のためのクロマトグラフィーシステムの一部分であり、ここでは例えば金属フィルターは上述の方法で変性させた表面を持つことができる。これらの原理を使って毛細管型クロマトグラフィー用カラムを作ることも可能である。更に表面導波は「インピボ」型の環境で使用するための生適合性を獲得するように変性させ得ることは明らかである。意图する特定の使用分野により、例えばヒドロゲルの実際の選択は肝ましくない相互作用を最小にするように行うことができる。当業者にとって上述の一連

特表平4-501605(5)

の例から多くの別の使用分野はたやすく明らかであろう。

本発明を更に例証する具体例において、16-メルカブトヘキサデカノールの層が金属に結合し、この金属上でパリアー層のヒドロキシル基はエピクロロヒドリンで処理することによりエポキシ活性化される。次の段階でデキストランをエーテル結合を介してパリアー層に付着させる。次にデキストランマトリックスはリガンドを結合させるため公知技術例えば次の原理の一つにより活性化される。

一つの具体例においては、ヒドロゲン機能がアルデヒド基を含むリガンド例えばアルデヒド機能を含むように活性化された炭水化合物を含む抗体を結合させるためデキストランマトリックス中に作られる。この場合デキストランマトリックスは最初にヒドロゲン基を形成するよう一部反応を受けたカルボキシメチル基により活性される。この活性化されたマトリックスにより少なくとも二つの重要な利益が得られる。すなわち1)このマトリックスは未反応のカルボキシル基を含み、これは低いイオン強度条件下でイオン交換剤として働き、又静電的相互作用により固定化されるべきリガンドはデキストランマトリックスに捕獲される。2)このマトリックスはリガンドのアルデヒド基とマトリックスのヒドロゲン機能とが結合することにより極めて有効にリガンドを結合させ表面に捕獲する。

又はジスルフィド含有リガンドの更新された共有結合を使用することができる。このようにして検出表面の化学的再生の能力を得ることができ、これは同一表面をいくつかの異なるリガンドの結合のため的一般的用途に使用することができる。この方法は例えば生物学的相互作用を研究する場合にも使用することができ、この相互作用は固定化されたリガンドに保持されている生物学的活性により破壊されることははない。

本発明の一つの重要な態様は所定の分析で使用する検出表面を形成する一つ又はそれより多い層はバイオセンサーシステムのフロースルーセルにおける表面に適当な試薬を添加することによりその場所で合成及び/又は官能化されることである。

要約すると、それと共に相互作用することにより生体分子の検出に使用することができる多數のリガンドが存在する。イオン交換性基、金属キレート化基及び種々な種類の生体分子用リセプター例えば慣用的な液体クロマトグラフ由で知られているようなそれが複雑な測定システムにおいてさえ選別目的に適当なシステムの構成に使用し得ることはたやすく明らかであろう。

この検出表面の新規な種類は多數の試料成分分析のため多重検出表面からなるシステムで測定を実行することを可能にする。このようなシステムにおいては、各々の特定の検出表面はその場所で所定の特異性を獲得するよう官能化されると極めて高度な多能性が得られる。こ

れの具体例においては、カルボキシメチル変性デキストランにおけるカルボキシル基の一部を反応性エステル機能を生ずるよう例えばN-ヒドロキシスクシンイミド及びN-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボキシミド塩酸の水溶液で処理することにより活性される。上述の場合と同じ方法で強電荷なわち未反応カルボキシル基はリガンドの表面への結合の進行に寄与するであろう。次いでアミノ基を含むリガンド例えばタンパク質とアミノ酸はデキストランマトリックスに共有結合により結合させることができる。

別な方法においては、前述の反応性エステルはジスルフィド含有化合物例えば2-(2-ビリジニルジチオ)エタノールアミンとの反応に利用される。この方法でジスルフィド基を含むマトリックスが得られ、及びこれらはチオール含有リガンド例えば免疫グロブリンの還元されたF(ab)断片との結合に使用することができる(Brocklehurst E等(1973年)参照)。ジスルフィド結合を例えば還元又はチオールジスルフィド交換により分裂させた後、形成されるチオール変性表面はジスルフィド含有リガンド例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ビリジニル)プロピオネート(SPDP)変性タンパク質の結合に使用することができる。

この方法の利点はリガンドを例えば還元処理により分裂させて反応性チオールを持つ検出表面が得られることである。このチオール変性表面は類似の方法でチオール

の場合そのような検出表面は最初に活性化されたデキストラン層を含み、官能化は検出表面の各々の対応する一つに適当なリガンド溶液を通過させることにより実行される。その後試料溶液を多重検出表面を通過させ、結合させた成分が検出される。

少なくとも2つの検出表面を持つセンサユニット並びにその官能化の方法は発明の名称が「センサユニットとそのバイオセンサーシステムにおける使用(Sensorunit and its use in biosensor systems)」と称する我々の係属中のPCT出願(スエーデン特許第8804074-6号に基づく)の目的であり、その開示は参考例としてここに組み入れる。

一つの具体例においては、いわゆるキメラ分子(二官能性又は多官能性分子)が検出表面を官能化させるため使用される。キメラ分子は基礎表面例えば前述のデキストラン被覆検出表面に結合しようとする部分と検出される生体分子に親和力を持つ他の部分とからなる。デキストランの場合キメラ分子は生物学的リガンド例えば免疫グロブリンに共役結合するデキストランに対する抗体からなることができる。このようにデキストラン抗体と複数な特異性の基とを含む一連のキメラ分子を用いて、一装置中に同じ種類のいくつかの検出表面を含むいわゆる測定用カセットを多數の生体分子の並行検出のため簡単な方法で活性化させることができる。他の方法においては、検出表面は表面にキメラ分子を結合させるため所謂

特表平4-501605 (6)

ハブテンで変性させる。例えば上述の反応性エステル表面をテオフィリンアナロドで修飾化し、次いでキメラ分子を結合させるために使用することができる。この場合キメラ分子はテオフィリンを抱負し、生・異的リガンドと結合する抗体からなる。これらの具体例から本発明の表面を使用する場合、使用は同一の基盤表面を簡単な方法でその所望のリガンド(=所望のリセプター)のいずれかをそこに付着させるために使用することができるから、高度の多能性に満足しえることは極めて明らかである。

(1)バイオセンサーシステムに使用する選択的生体分子相互作用の可能な表面を持つ金属表面を作る前述の方法、(2)上述の表面、及び(3)それらのバイオセンサーへの使用に関する本発明は、下記の実施例により開示するがそれのみに限定されるものではない。金属はもちろん各々の場合意図する特定の測定法に適当な基体、例えばSPRの場合はガラス板に適用される。基体の選択は本発明の部分を形成しない事實を考慮し、本明細書と同様に下の実施例は全体として検出表面、すなわちその上に付着した層を持つ金属表面のみに適用する。

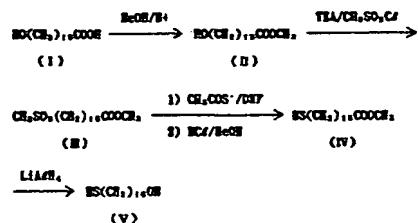
本発明の検出表面は種々なバイオセンサーシステム及び特にSPR例えば「光学的バイオセンサーシステム(Optical Biosensor System)」と称する我々の係員中のPCT出願(スエーデン特許願第8804075-3号に基づく)に記述されているそれに使用することができ、その開示

は参考例としてここに組み入れる。

1. 検出表面製造の実施例

1.1 16-メルカブトヘキサデカノールの合成

16-メルカブトヘキサデカノールを次の反応略図により合成した。



16-メルカブトヘキサデカノール(IV)は公知の方法により開発した(Crossland KK等(1970年)、Ghosh SS等(1987年)及びVolante RP(1980年)、及びこれらの刊行物に引用されている参考例)。

(IV)の16-メルカブトヘキサデカノールへの還元は次のように実行した。

70gのトルエンに溶解した16-メルカブトヘキサデカノールエチルエステル12.0g(41.7mmol)をトルエン中リチウムアルミニウムヒドリド-ビス-テトラヒドロフラン(1M)の70mL(70mmol)に量しく攪拌しながら注意深く滴加した。この添加の間温度は25°Cより下に維持した。

反応を室温で20分間進行させた。過剰のヒドリドを酢酸エチルで100mLの2M塩酸で分解した。層を分離した。水層を100mLのトルエンで抽出した。合併した有機層を100mLの2M硫酸水素ナトリウムで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し蒸発した。

収量10.0g(87.2%)：GLCによる純度96%。

生成物をメタノールからの再結を繰り返して精製した。>99%の純度は許容されると判断した。融点55.0~56.0°C。

1.2 Au被覆ガラス表面の基礎結合

1.2.1 16-メルカブトヘキサデカノールの化学吸着

5インチの金被覆ガラスウェハーを皿に積んだベトリ皿(内径16cm)中に置いた。エタノール/水(80/20)中16-メルカブトヘキサデカノールの5.0mM溶液の40mLを表面に注いだ。ベトリ皿を40°Cの振盪インキュベーターで20分間インキュベートした。表面を5×50mLの水、50mLのエタノール/水80/20、及び5×50mLの水で洗浄した。表面のサイクリックポルタメトリー分析は膜が有效地に金の被覆化を防ぐことを示した。

1.2.2 エピクロロヒドリンによる処理

16-メルカブトヘキサデカノールで被覆した表面を20mLの0.4M水酸化ナトリウム及び20mLのジエチレンギリコールジメチルエーテル中2.0mLのエピクロロヒドリンの浴液に接触させた。25°Cの振盪インキュベーター中で4時間反応を進行させた。表面を2×50mLのエタノール

及び5×50mLの水で洗浄した。

1.2.3 デキストランによる処理

13.5gのデキストラン(T500, Pharmacia)を40.5mLの水に溶解した。4.5mLの1M水酸化ナトリウムを添加し、溶液をエピクロロヒドリン処理表面上に注いだ。次に振盪インキュベーター中で25°Cで20時間インキュベートした。表面を15×50mLの50°Cの水で洗浄した。

1.3 基盤表面の誘導体化

1.3.1 ヒドログリド表面の合成

プロモ酢酸3.5gを27mLの2M水酸化ナトリウム溶液に溶解した。混合物を1.2.3によりデキストラン処理表面に注ぎ、25°Cの振盪インキュベーターで16時間インキュベートした。表面を水で洗浄し、その後上述の手順を1回繰り返した。

洗浄した後、表面を20mLの水中0.8gのN-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸(EDC)で5分間処理し、次いで20mLの水中4.0mLのヒドログリドキシドを添加した。表面を25°Cの振盪インキュベーターで16時間インキュベートし、次いで水で洗浄した。

1.3.2 反応性エステル機能を持つ表面の合成

30mLの水に0.89gのN-ヒドロキシスクシンイミドと1.15gのBSCを溶解した。混合物を1.3.1によるカルボキシメチル変性デキストラン表面に注ぎ、25°Cの振盪インキュベーターで60分間インキュベートした。表面を水で

特表平4-501605(7)

洗浄した。

1.3.3 テオフィリン表面の合成

0.1M 塩酸塩緩衝液 (pH8.0) 中 5 mM の 8-(8-アミノプロピル)-テオフィリン (E.C. Boguslaski 等、1980 年) の溶液を N-ヒドロキシスクシニミドエステル活性化デキストラン表面 (実施例 1.3.2 による) と共に 25 ℃で一晩インキュベートし、次いで表面を水で洗浄した。

II リガンドの酵素化した基質表面への結合

II.1 抗 IgE 抗体

10 mM 酵素緩衝液 (pH5.5) 中抗 IgE 抗体 (Pharmacia Diagnostics AB) を O' Shanney (1985 年) により記述された方法により 10 mM 酵素緩衝液ナトリウムで水浴中で 20 分間酵素化した。緩衝液を置換した後、抗体を 10 mM 酵素緩衝液 (pH4.0) 中でヒドロジド活性デキストラン表面に結合させた。結合しなかった抗体を 0.1M グリシン (pH8.5) で溶解した。

II.2 抗ペータ-2-ミクログロブリン抗体

抗ペータ-2-ミクログロブリン抗体 (Pharmacia Diagnostics AB) を実施例 II.1 のように酸化し、ヒドロジド活性デキストラン表面に結合させた。

II.3 ウサギ抗マウス軽鎖抗体 (RAELC)

10 mM 酵素緩衝液 (pH5.5) 中 RAELC 抗体を N-ヒドロキシスクシニミドエステル酵素化デキストラン表面に 20 分間かけて結合させ (実施例 1.3.2 による)、次いで

結合しない抗体を PBS 緩衝液 (pH7.4) と 0.1M グリシン (pH8.5) 中で表面を洗浄することにより除去した。

II.4 SPR 法を使用する 生体分子試験

検出表面をフローセル 持つ SPR 計測装置に導入した。光学強度を調整した後測定シグナルを一定流量条件下で時間の関数として調べた。

II.5 モノクローナル抗体の濃度とサブクラス同一性の測定

モノクローナル抗体を含む培養培地を検出表面上に RAELC 抗体の共有固定化した後注入した (実施例 II.3)。

第 1 図は (1) 培養培地の注入、(2) モノクローナル抗体を含む培養培地の注入、及び (3) 0.1M グリシン (pH8.5) による再生について得られた応答曲線を示す。

第 2 図は種々な濃度のモノクローナル IgG1 抗体の標準曲線を示す。*4 当り 5 ~ 100 μg 抗体の範囲で用量応答曲線の精度は ±10% より良好である。

第 3 図はサブクラス特異的試薬の注入と結合モノクローナルの IgG1 抗体としての固定を示し、図中 (1) 表面結合モノクローナル抗体であり、続いて (2) 抗 IgG2a、(3) 抗 IgG3、(4) 抗 IgG2b、及び (5) 抗 IgG1 の注入による結果を示す (これらは表面に結合する)。システムが可逆的に反復可能なことを立証するため、抗体結合とサブクラス固定を同一表面で 100 回繰り返した。

II.6 抗テオフィリン複合体のセンサー分子の固体としての親和力研究と速度論研究

タンパク質 A とタンパク質 G を抗テオフィリン抗体との複合体 (ヤメラ分子) の形態でテオフィリン表面に導入した。この方法でタンパク質 A 又はタンパク質 G と種々なサブクラスのモノクローナル抗体との間の相互作用を研究することができた。

複合体の調製

モノクローナル抗テオフィリン抗体 No. 459、種々な異なる IgG サブクラスのモノクローナル抗体、IgG1 サブクラス No. E 184、95 及び 121 のモノクローナル抗 IgE 抗体及び IgG を Pharmacia Diagnostics AB から入手した。抗テオフィリン抗体をペプシンで分解して P(ab)' - 2 断片を形成させるか、又は無傷の抗体として使用した。タンパク質 A、タンパク質 G 及び SPDP は Pharmacia LKB Biotechnology AB から入手した。

タンパク質 A - 抗テオフィリン複合体は Carlsson 等 (1978 年) により記述された方法によりこれら分子の双方の SPDP 活性により調製した。変性させたタンパク質 A を 10 mM の DTG (1,4-ジチオエリスリトール) で還元した後、1.8 の変性度 (分子当たりビリジルスルフィド基) を持つ抗テオフィリンの 3.8 μg を 1.3 の変性度 (チオール / 分子) を持つ還元されたタンパク質 A の 13.8 μg と混合した。

接着を 0.1M 塩化ナトリウムを含む 0.1M リン酸緩衝液中で pH7.7 で一晩進行させた。タンパク質 G の抗テオフィリンの P(ab)' - 2 断片との複合体を同様の方法で調製

した。

分析

結合テオフィリンを持つ検出表面は上述の複合体により容易に官能化される。2 つの平行する検出表面、それらの 1 つはタンパク質 A 複合体により他のタンパク質 G 複合体により官能化されているそれらを用いて、一連の免疫グロブリンにつきタンパク質 A 及びタンパク質 G との親和力をそれぞれ極めて迅速に比較することが可能であった。得られた結果は例えば Guss 等 (1986 年) により報告されているこれらの点に関する差異を確認している。

この実験は速度論と親和力の定性的測定を速やかに実行する可能性のみならず、それぞれの場合における適当な試薬を用いてそのような検出表面は広範囲の種々な検定に利用できることから本発明の検出表面を使用する方法の選択性をも例証するものである。

II.7 所謂サンドウィッヂ法を使用するペータ-2-ミクログロブリンの検定

実施例 II.2 により調製した抗ペータ-2-ミクログロブリン抗体を含む検出表面を用いてペータ-2-ミクログロブリン (Pharmacia Diagnostics AB) の測定を行った。検出表面に結合させたペータ-2-ミクログロブリンの測定シグナルを培養中のその濃度の関数として、直接 (第一次応答) 及び第二次免疫吸着剤 - 構造抗体によりシグナル増強させた後 (第二次応答) の両方の場合に

特表平4-501605 (B)

力学のためタンパク質の「多層結合」を作る可能性を示すものである。

参考文献

つき記述した。ここで同記特許技体は第一次結合させたペータ-2-1クロログロブリンを介して表面に結合して所謂サンドwich構造を形成する。この明白で実験的に簡単な方法は少なくとも10倍低い検出感度を与える。

IV 検出表面に吸着させたタンパク質量の測定

1.3.1に記述されたカルガキシメチル変性デキストラン表面に吸着させたタンパク質量の重量を放射能法を用いて行った。¹⁴C又は³⁵Sでラベルしたタンパク質(免疫グロブリンG、キセトリブシンノーゲンA及びトランスフェリン)をSPE測定装置の中に保った表面にイオン交換により洗浄した。表面が乾燥した後角度の変化を記録し、SPE測定装置から除いた。次いで表面上の¹⁴Cラベルタンパク質の量を表面からのペータ線放射を測定することにより装置中で定量した。放射能法の検量は吸着させたタンパク質の表面濃度の絶対値を与える。第4図はSPE測定装置からの応答のペータ線測定から得られる表面濃度との関係を示しており、種々な実験条件で78の測定を行った。50ng/mm²までのタンパク質濃度を持つ表面が得られ、これはトランスフェリンの約10倍高い厚さに相当する。これは記述されたヒドロゲルの能力を示し、本発明の生産性多孔質マトリックスの検出表面を使用することにより達成される大きな測定シグナル増強効果を実証するものである。同様な表面濃度は反応性エチル機能を持つ表面にタンパク質を固定化させることにより達成され、このことは種々なSPE測定における増強された

Boguslaski EC等(1989年)、*Issuesassays: Clinical Laboratory Techniques for the 1980s*, Nakamura RU、Dito R及びTucker RS編集、監修: JBL, New York 1980、45~84ページ

Brocklehurst K等(1973年)、*Biochem J*, 133巻、573ページ

Carlson J等(1978年)、*Biochem J*, 173巻、723ページ

Crossland RK等(1970年)、*J Org Chem*, 35巻、8195ページ

Cullen DC等(1978/88年)、*Biosensors*, 3巻、211~225ページ

Ebosh SS等(1987年)、*J Org Chem*, 52巻、802ページ

Guss B等(1985年)、*The ENB Journal*, 5巻(7号)、1567~1575ページ

Liedberg B等(1983年)、*Sensors and Actuators*, 4巻、289~304ページ

Merrill等(1986年)、*Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, II巻、Peppas RA編集、1章、CRC Press

Nozzo RG等(1983年)、*J Am Chem Soc*, 105巻、4481~4488ページ

O'Shannessy DJ(1985年)、*J Appl Biochem*, 7巻、

347ページ

Porter ED等(1987年)、*J Am Chem Soc*, 109巻、3559~3568ページ

Raether B(1977年)、*Physics of Thin Films*, Bass G、Franccombe R及びHoffman E編集、Academic Press, New York, 145~261ページ

Regen SL等(1986年)、*J Am Chem Soc*, 108巻、6094~6095ページ

Rieddorf B等(1988年)、*Angew Chem Int Ed Engl*, 27巻、113~158ページ

Troughton EB等(1988年)、*Langmuir*, 4巻、365~385ページ

Volante RP(1981年)、*Tetrahedron Lett*, 22巻、3119ページ

FIG. 1

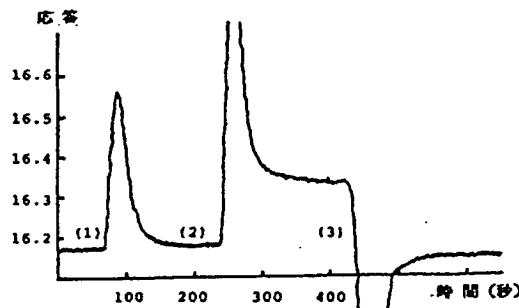


FIG. 2

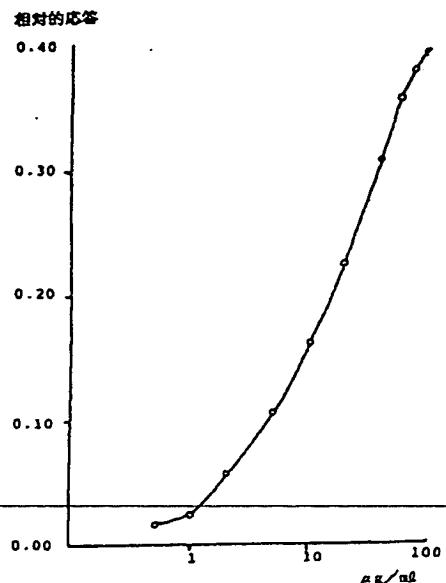


FIG. 3

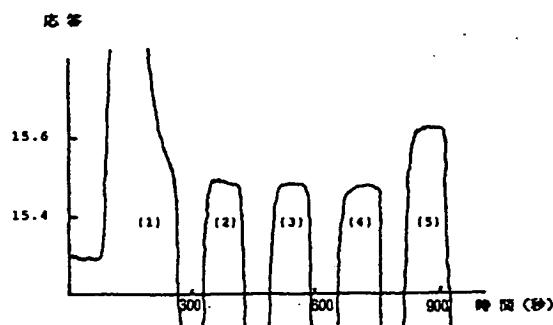
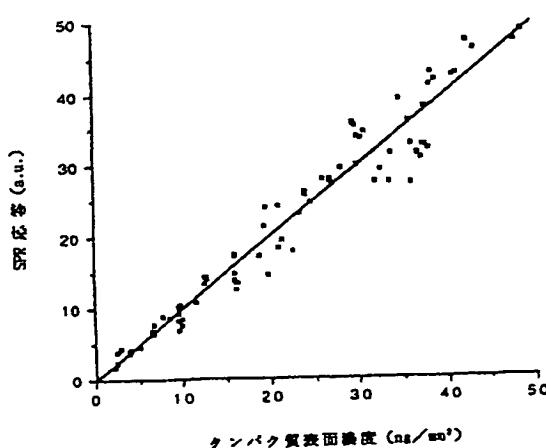


FIG. 4



International Application No. PCT/SE 89/00542		
I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER International Classification Number, Class, Subclass and Divisional Class IPC: H 01 N 33/53, 33/547, C 12 G 1/00		
II. PRIOR ART SEARCHED International Classification Sought Classification system: Classification system		
IPCS H 01 N; C 12 G; C 12 M; C 07 K International Classification above Minimum Requirements to the Classes least restrictive Requirements are indicated in the Prior Art Searched		
SE, DK, F1, HD classes as above		
III. DOCUMENTS RELEVANT TO THE INVENTION*		
Category * Classification of Document: Type of document, date of publication, classification of the relevant document, if applicable, and reference to claim No. *		
A	EP, A2, 0225187 (ARES-SERONO RESEARCH & DEVELOPMENT LIMITED PARTNERSHIP) 27 July 1988, see the whole document. --	1-14
A	EP, A2, 0225470 (J.A. BOSLEY ET AL.) 24 June 1987, see the whole document --	1-14
A	EP, A2, 0254575 (ARES-SERONO RESEARCH & DEVELOPMENT LIMITED PARTNERSHIP) 27 January 1988, see the whole document --	1-14
A	Lengauer, Vol. 4, No. 2, 1983 E.B. Troughton et al.: "Monolayer films prepared by spontaneous self-assembly of symmetrical and unsymmetrical (ca) dialkyl sulfides", see page 363 - page 385	1-14
* Patent documents of other countries: --		
** Other publications prior art which have been taken into account in the examination of the application for patent or in the examination of the opposition against the granted patent. See also the section "Opposition".		
*** Publications which are cited in the patent application as examples or references, or which are cited in the patent application as prior art, or which are cited in the patent application as evidence of priority, or which are cited in the patent application as evidence of other grounds.		
**** Publications which are cited in the international filing date but later than the priority date.		
IV. CERTIFICATION		
International Classification of the International Bureau 12/01/1990	Date of mailing of International Search Report 1990-11-23	
International Searching Authority SWEDISH PATENT OFFICE International Bureau SWEDISH PATENT OFFICE		

特表平4-501605 (10)

日 載 記 來 報 告

PCT/SE 89/00642

II. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		SEARCHED FROM THE SECOND SHEET	
Category	Date of Document, with reference, where appropriate, of the relevant paragraph		Reference to Clerk No.
A	Biosensors, Vol. 3, 87/88,D.C. Cullen et al; "Detection of immuno-complex formation via surface plasmon resonance on gold-coated diffraction gratings", see page 211 - page 225 - -		I-14

Patent Application Filed in World Patent Office	Pending Date	Patent Search Institution	Pending Date
EP-A1- 0276142	27/07/83	AU-O- JP-A-	106311/83 03/11/1982
EP-A2- 0225470	24/06/87	JP-A-	02156361
EP-A2- 0254575	27/01/83	AU-O- JP-A-	760077/87 03/10/1985

第1頁の統計

⑤ Int. Cl. *
G 01 N 33/553

識別記号 庁内整理番号
7906-2J

⑦発明者 リヨーフオス, ステファン
⑧発明者 ヨーンソン, ポー

スウェーデン国エスー-752 28 ウブサラ。フローラガタン 16
スウェーデン国エスー-743 00 ストルヴレータ。モンシエンスヴ
エイエン24